

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-191886

(43)Date of publication of application : 28.07.1998

(51)Int.Cl.

A23D 9/007  
A23C 9/152  
A23L 1/30  
C12P 7/64  
// (C12P 7/64  
C12R 1:645 )

(21)Application number : 08-289172

(71)Applicant : SUNTORY LTD  
NIPPON SUISAN KAISHA LTD

(22)Date of filing : 11.10.1996

(72)Inventor : HIGASHIYAMA KENICHI  
AKIMOTO KENGO  
SHIMIZU AKIRA  
DOISAKI NOBUSHIGE  
FURUHATA KIYOMI

(54) ARACHIDONIC ACID-CONTAINING EDIBLE FATS AND OILS AND FOOD CONTAINING THE SAME

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain arachidolic acid-contg. edible fats and oils which are the arachidolic acid-contg. edible fats and oils obtainable from the microorganisms belonging to the Mortierella subgenus of Mortierella genus having arachidolic acid producibility, are low in the content of unsaponifiable materials, do not contain sterol having the cyclopropane ring having no dietary experience in particular among these materials as far as possible and are particularly suitable for production of prepd. milk for infants.

SOLUTION: The arachidolic acid-contg. edible fats and oils have  $\leq 0.8\text{wt.}\%$ , more preferably  $\leq 0.6\text{wt.}\%$  unsaponifiable material content and  $\geq 20\text{wt.}\%$  arachidolic acid content and are derived from the microorganisms. The edible fats and oils are  $\leq 0.3\text{wt.}\%$ , more preferably  $\leq 0.15\text{wt.}\%$  24,25-methylencholesto-5-en-3 $\beta$ -ol. The microorganisms are the microorganisms belonging to the Mortierella subgenus of Mortierella genus having productive ability of the arachidolic acid. The microorganisms belonging to the Mortierella subgenus are the microorganisms belonging to the Mortierella genus Alpine species.

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-191886

(43)公開日 平成10年(1998)7月28日

(51)Int.Cl.<sup>8</sup>  
A 2 3 D 9/007  
A 2 3 C 9/152  
A 2 3 L 1/30  
C 1 2 P 7/64  
// (C 1 2 P 7/64

識別記号

F I  
A 2 3 D 9/00 5 1 6  
A 2 3 C 9/152  
A 2 3 L 1/30 Z  
C 1 2 P 7/64

審査請求 未請求 請求項の数8 F D (全 8 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平8-289172

(22)出願日 平成8年(1996)10月11日

(71)出願人 000001904  
サントリー株式会社  
大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号

(71)出願人 000004189  
日本水産株式会社  
東京都千代田区大手町2丁目6番2号

(72)発明者 東山 堅一  
大阪府三島郡島本町山崎1-9-5-602

(72)発明者 秋元 健吾  
大阪府三島郡島本町山崎1-9-5-1006

(72)発明者 清水 昌  
京都府京都市中京区西ノ京伯楽町14

(74)代理人 弁理士 須藤 阿佐子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 アラキドン酸含有食用油脂およびそれを含有する食品

(57)【要約】 (修正有)

【課題】 アラキドン酸生産能を有するモルティエラ属のモルティエラ亜属に属する微生物から得られるアラキドン酸含有油脂であって、不ケン化物含量が少なく、その中でも特に食経験のないシクロプロパン環を有するステロールを極力、含有せず、食品、特に乳幼児用調製乳の製造に適したアラキドン酸含有食用油脂の提供。

【解決手段】 不ケン化物含量が0.8重量%以下、好ましくは0.6重量%以下で、かつ、アラキドン酸含量が20重量%以上である微生物由来のアラキドン酸含有食用油脂。さらに上記食用油脂は、24,25-メチレンコレスト-5-エン-3β-オールが0.3重量%以下、好ましくは0.15重量%以下である。微生物がアラキドン酸生産能を有するモルティエラ属のモルティエラ亜属に属する微生物である。上記モルティエラ亜属に属する微生物はモルティエラ属アルビナ種に属する微生物である。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 不ケン化物含量が0.8重量%以下で、かつ、アラキドン酸含量が20重量%以上である微生物由来のアラキドン酸含有食用油脂。

【請求項2】 不ケン化物含量が0.6重量%以下である請求項1の微生物由来のアラキドン酸含有食用油脂。

【請求項3】 さらに24, 25-メチレンコレスト-5-エン-3β-オールが0.3重量%以下である請求項1又は2の微生物由来のアラキドン酸含有食用油脂。

【請求項4】 24, 25-メチレンコレスト-5-エン-3β-オール含量が0.15重量%以下である請求項3の微生物由来のアラキドン酸含有食用油脂。

【請求項5】 前記微生物がアラキドン酸生産能を有するモルティエラ属のモルティエラ亜属に属する微生物である請求項1ないし4のいずれかの微生物由来のアラキドン酸含有食用油脂。

【請求項6】 前記モルティエラ亜属に属する微生物が、モルティエラ属アルピナ種に属する微生物である請求項5の微生物由来のアラキドン酸含有食用油脂。

【請求項7】 請求項1ないし6のいずれかのアラキドン酸含有食用油脂を配合してなる食品。

【請求項8】 請求項1ないし6のいずれかのアラキドン酸含有食用油脂を配合してなる、未熟児用調製乳、幼児用調製乳、幼児用食品、又は妊産婦用食品。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、不ケン化物の少ない、アラキドン酸生産能を有するモルティエラ属のモルティエラ亜属に属する微生物由来のアラキドン酸含有食用油脂及びこれを配合した食品、特に乳幼児用調製乳に関する。本発明において、「不ケン化物」とは、微生物由来のものをいう。従って本発明で不ケン化物という用語は、後から添加したものを含まない微生物由来のものを指している。

## 【0002】

【従来の技術】アラキドン酸は、子宮筋収縮、弛緩作用、血管拡張、血圧降下作用等、強力かつ多彩な生理活性を有するプロスタグランジン、トロンボキサン、プロスタサイクリン、ロイコトリエン等の前駆物質といわれ、近年注目されているが、特に乳児の発育に必要な成分として、DHA（ドコサヘキサエン酸）とともに急速に研究が進められている。すなわちLantingらは生後3週間以上母乳で育てた乳児と育児用粉乳で育てた乳児を9歳まで追跡調査し、行動面などから脳神経の小さな障害の発生率を検討した結果、育児用粉乳で育てた子供の脳障害発生率は母乳で育てた子供の2倍であると報告した〔LANCET、Vol. 344, 1319-1322（1994）〕。このショッキングな結果は母乳には存在するが育児用粉乳にはほとんど存在しないDHAおよびアラキドン酸などの長鎖不飽和脂肪酸が脳の発

達に関係したためだろうと推測されている。育児用粉乳を、乳児にとって理想の栄養とされる母乳に近づける研究が以前より行われてきたが、今までそれら母乳の基本的な栄養素、ビタミン、ミネラルなどと感染防御作用の解明に重点が置かれてきた。しかしながら最近では、長鎖多価不飽和脂肪酸の脳への影響にも関心が向けられつつある。このほかにも近年、長鎖不飽和脂肪酸が新生児の脳および網膜の発達に関係しているだろうとする結果が相ついで報告されるようになり、未熟児および新生児栄養の領域においてホットな話題として注目されている。アラキドン酸を大量に含有し、しかも食品、特に乳幼児用調製乳に安全に使用できる油脂の開発が望まれている。

【0003】このようなアラキドン酸は、動物界に広く分布しており、従来、動物の副腎腺や肝臓から抽出した脂質から分離されている。しかしながらアラキドン酸の含有量は少なく、また原材料の大量入手が困難であることなどから、アラキドン酸の供給方法としては不十分であった。一方、アラキドン酸生産能を有する種々の微生物を培養してアラキドン酸を得る方法が提案されている。この中でも、特にモルティエラ属の微生物を用いることによって、アラキドン酸高含有油脂が得られることが知られている（特開昭63-44891、特開昭63-12290）。しかしこれらの油脂は安全性が高いと言われながらも微生物起源という問題により、世間に十分浸透しているわけではない。モルティエラ属アルピナ種の微生物を培養して得られる油脂は、その大部分がトリグリセリド（約70重量%以上）及びリン脂質であり、この他にデスモステロール等の不ケン化物が含まれている。この不ケン化物の中には、それまで天然に存在することが知られていなかったシクロプロパン環を有するステロール、具体的には24, 25-メチレンコレスト-5-エン-3β-オール（24, 25-methylenecholest-5-en-3β-ol）が存在することが確認されている〔LIPIDS、Vol. 27, No. 6, 481-483（1992）〕が、不ケン化物を構成する成分についての解明は十分ではない。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】そこで、本発明者等は、現段階では、アラキドン酸生産能を有するモルティエラ属のモルティエラ亜属に属する微生物の培養物から得られるアラキドン酸含有油脂においては、食経験の知られていない物質あるいは構造が解明されていない物質は極力、取り除くことが望ましいと考えた。従って本発明は、アラキドン酸生産能を有するモルティエラ属のモルティエラ亜属に属する微生物から得られるアラキドン酸含有油脂であって、不ケン化物含量が少なく、その中でも特に食経験のないシクロプロパン環を有するステロールを極力、含有せず、食品、特に乳幼児用

調製乳の製造に適したアラキドン酸含有食用油脂を提供しようとするものである。

#### 【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者等は、アラキドン酸生産能を有するモルティエラ属に属する微生物の培養物から得られるアラキドン酸含有油脂においては、培養条件によって24, 25-メチレンコレスト-5-エン-3β-オール組成比を少なくすることができることを発見し、その発見により、食経験の知られていない物質あるいは構造が解明されていない物質が極力、取り除かれたアラキドン酸含有油脂製造しようという方向性、すなわち新しい課題に思い至った。そこで、本発明者等は、上記の課題を達成するため、種々研究の結果、アラキドン酸生産能を有するモルティエラ属のモルティエラ亜属に属する微生物を栄養培地で常法により培養したのち集菌し、該菌体からアラキドン酸高含有油脂を回収し、該油脂を通常の食用油脂の精製工程の脱ガム、アルカリ精製、脱色、脱臭などの操作を適宜組み合わせることによって、アラキドン酸含量に影響を与えず、不ケン化物を低下させ、シクロプロパン環を有するステロール等の食経験の知られていない物質あるいは構造が解明されていない物質を減少できることを見だし本発明を完成するに至った。

【0006】従って本発明は、不ケン化物含量が0.8重量%以下で、しかもアラキドン酸を20重量%以上含有する微生物由来のアラキドン酸含有食用油脂に関する。また、本発明は、不ケン化物含量が0.6重量%以下で、しかもアラキドン酸を20重量%以上含有する微生物由来のアラキドン酸含有食用油脂に関する。また、本発明は、不ケン化物含量が0.8重量%好ましくは0.6重量%以下で、しかもアラキドン酸を20重量%以上含有し、24, 25-メチレンコレスト-5-エン-3β-オール含量が0.3重量%以下好ましくは0.15重量%以下であるアラキドン酸含有食用油脂に関する。さらにまた、本発明はこれらの油脂を配合してなる、未熟児用調製乳、幼児用調製乳、幼児用食品、又は妊産婦用食品等の食品に関する。

#### 【0007】

【具体的な説明】本発明の油脂はアラキドン酸生産能を有するモルティエラ (*Mortierella*) 属のモルティエラ亜属に属する微生物を培養しその培養物から得られる微生物油であって、油脂に対し不ケン化物含量が0.8重量%以下、好ましくは0.6重量%以下、より好ましくは0.5重量%以下であり、しかも油脂中の総脂肪酸に対しアラキドン酸を20重量%以上、好ましくは30重量%以上、より好ましくは35重量%以上含有する。

【0008】さらに本発明の油脂は、24, 25-メチレンコレスト-5-エン-3β-オール含量が0.3重量%以下、好ましくは0.15重量%以下、より好まし

くは0.04重量%以下であることが望ましい。また本発明の油脂は、油脂中トリグリセリドを70%以上、好ましくは90重量%以上、より好ましくは92重量%以上含有することが望ましい。

【0009】また本発明の油脂は、水分が0.1%以下、酸価が0.5以下、過酸化値が5以下であり、色は、ロビボンダ法133.4mmセルにおいて黄が50以下、赤が10以下であり、アラキドン酸以外の脂肪酸を、ミリスチン酸が0.2~0.7%、パルミチン酸が10~16%、ステアリン酸が4~10%、オレイン酸が5~15%、リノール酸が5~15%、γ-リノレン酸が1~5%、α-リノレン酸が0.1~2%、ジホモγ-リノレン酸が1~6%、エイコサペンタエン酸が0~1%、リグノセレン酸が2~7%含有することが望ましい。

【0010】本発明の食用油脂の製造に使用する微生物は、モルティエラ (*Mortierella*) 属のモルティエラ亜属に属し、アラキドン酸生産能を有する微生物であれば、すべて使用することができる。このような微生物としては、例えばモルティエラ・エロンガタ (*Mortierella elongata*) IFO 8570、モルティエラ・エキシグア (*Mortierella exigua*) IFO 8571、モルティエラ・フィグロフィラ (*Mortierella hygrophila*) IFO 5941、モルティエラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) IFO 8568、ATCC 16266、ATCC 32221、ATCC 42430、CBS 219.35、CBS 224.37、CBS 250.53、CBS 343.66、CBS 527.72、CBS 529.72、CBS 528.72、CBS 608.70、CBS 754.68等を挙げることができる。これらの菌株はいずれも、大阪市の財団法人醗酵研究所 (IFO)、及び米国アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (American Type Culture Collection (ATCC)) 及びCentraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) からなんら制限なく入手することができる。また、本発明者らが土壌から分離した菌株モルティエラ・エロンガタ SAM 0219 (微工研菌寄第8703号) (微工研条寄第1239号) を使用することもできる。これらのタイプカルチャーに属する菌株、あるいは自然界から分離した菌株は、そのまま用いることができるが、増殖及び/又は単離を1回以上行うことによって得られる元の菌株とは性質の異なる自然変異株を用いることもできる。

【0011】また、本発明に用いる微生物は、モルティエラ (*Mortierella*) 属のモルティエラ亜属に属し、アラキドン酸生産能を有する微生物 (野性株) の変異株又は組換え株、即ち、同じ基質を用いて培

養したときに、元の野性株が産生する量と比べて、油脂中のアラキドン酸含量が多くなるように、または総油脂量が多くなるように、あるいはその両方を意図して設計されたものが含まれる。さらに費用効果の優れた基質を効率よく用いて、対応する野性株と同量のアラキドン酸を産生するように設計された微生物も含まれる。

【0012】アラキドン酸生産能を有する微生物は、常法に従って培養することができる。例えば、その菌株の孢子、菌糸又は予め培養して得られた前培養液を、通常の液体培地又は固体培地に接種し培養することができる。液体培地の場合に、炭素源としてはグルコース、フラクトース、キシロース、サッカロース、マルトース、可溶性デンプン、糖蜜、グリセロール、マンニトール、クエン酸、コーンスターチ等の一般的に使用されているものがいずれも使用できるが、特にグルコース、フラクトース、マルトース、グリセロール、クエン酸、コーンスターチが好ましい。窒素源としてはペプトン、酵母エキス、麦芽エキス、肉エキス、カゼミノ酸、コーンステフィリカー、尿素等の有機窒素源、ならびに硝酸ナトリウム、硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム等の無機窒素源を用いることができる。

【0013】また窒素源として大豆から得られる栄養源を用いることにより、油脂中の24, 25-メチレンコレステ-5-エン-3 $\beta$ -オール組成比(油脂中の総ステロールに対する割合)を少なくすることができる。本発明で使用することができる大豆から得られる窒素源は、水分を除く成分あたりの窒素含量が2%以上、好ましくは3%以上、より好ましくは5%以上であることが望ましい。また大豆から得られる窒素源としては、脱脂大豆又はこれに熱処理；酸処理；アルカリ処理；酵素処理；化学修飾；熱処理、酸処理、アルカリ処理、酵素処理、化学修飾等を含む化学的及び／又は物理的处理による変性及び／又は再生；水及び／又は有機溶媒を用いた一部成分の除去；濾過及び／又は遠心分離による一部成分の除去；凍結；粉碎；乾燥；篩分け等の加工を施したもの、あるいは未脱脂大豆に同様の加工を施したものを単独で又は複数組み合わせ使用することができ、一般的なものとしては大豆、脱脂大豆、大豆フレーク、食用大豆タンパク、おから、豆乳、きな粉等が挙げられるが、特に脱脂大豆に熱変性を施したもの、より好ましくは脱脂大豆に熱変性を施しさらにエタノール可溶性成分を除去したものが好ましい。

【0014】この他に必要に応じリン酸塩、塩化カルシウム、塩化マグネシウム、硫酸マグネシウム、硫酸鉄、硫酸銅、硫酸ナトリウム等の無機塩及びビタミン等も微量栄養源として使用できる。この培地成分は微生物の生育を害しない濃度であれば特に制限はない。実用上一般に、炭素源は0.1~30重量%、好ましくは0.5~15重量%、さらに好ましくは1~15重量%の濃度とし、窒素源は0.01~10重量%、好ましくは0.1

~5重量%の濃度とすることが望ましい。また培養温度は、5~40℃、好ましくは20~30℃とし、培地のpHは4~10、好ましくは5~8として通気攪拌培養、振盪培養、又は静置培養を行う。培養は通常2~20日間行う。

【0015】固体培地で培養する場合は、固形物重量に対して50~100重量%の水を加えたふすま、もみがら、米ぬか等を用い、5~40℃、好ましくは20~30℃の温度において3~20日間培養を行う。この場合に必要に応じて培地中に窒素源、無機塩類、微量栄養源を加えることができる。

【0016】アラキドン酸の生産量を増加せしめるために、アラキドン酸の前駆体として、例えば、ヘキサデカンもしくはオクタデカンのごとき炭化水素；オレイン酸もしくはリノール酸のごとき脂肪酸又はその塩、例えばナトリウム塩もしくはカリウム塩、又は脂肪酸エステル、例えばエチルエステル、ソルビタン脂肪酸エステル、グリセリン脂肪酸エステル；又はオリーブ油、綿実油もしくはヤシ油のごとき油脂類を単独で、又は組み合わせ添加することができる。これらの添加物は一度に添加することもでき、又は連続的に、もしくは複数回に分けて経時的に添加することもできる。培養開始前においては炭化水素、脂肪酸もしくはその塩、又は油脂類の添加が好ましく、培養中においては脂肪酸もしくはその塩又は脂肪酸エステル、又は油脂類の添加が好ましい。

【0017】このように培養して、菌体内に、アラキドン酸を含有する脂質が生成蓄積される。液体培地を使用した場合には、培養菌体から次のようにしてアラキドン酸含有脂質の回収を行う。

【0018】培養終了後、培養液より遠心分離及び／又は濾過等の常用の固液分離手段により培養菌体を得る。培養菌体は好ましくは、水洗、破碎、乾燥する。乾燥は、凍結乾燥、風乾等によって行うことができる。乾燥菌体は、好ましくは窒素気流下で有機溶媒によって抽出処理する。有機溶媒としてはエーテル、ヘキサン、メタノール、エタノール、クロロホルム、ジクロロメタン、石油エーテル等を用いることができ、またメタノールと石油エーテルの交互抽出やクロロホルム-メタノール-水の一層系の溶媒を用いた抽出によっても良好な結果を得ることができる。抽出物から減圧下で有機溶媒を留去することにより、高濃度のアラキドン酸含有油脂を得ることができる。

【0019】また、上記の方法に代えて湿菌体を用いて抽出を行うことができる。この場合にはメタノール、エタノール等の水に対して相溶性の溶媒、又はこれらと水及び／又は他の溶媒とからなる水に対して相溶性の混合溶媒を使用する。その他の手順は上記と同様である。

【0020】上記のようにして得られたアラキドン酸含有脂質は、その大部分がトリグリセリド(約70重量%以上)及びリン脂質(約30重量%以下)であり、この

他にデスモステロール等の不ケン化物が含まれている。そして該不ケン化物の中には構造が解明されていない物質や食経験が知られていない物質、例えば食経験が知られていないシクロプロパン環を有するステロールが存在しており、具体的には24, 25-メチレンコレステ-5-エン-3β-オールが存在している。

【0021】本発明の油脂は、上記アラキドン酸生産能を有するモルティエラ属のモルティエラ亜属の微生物を培養して得られたアラキドン酸含有油脂に以下の精製処理を施すことにより製造することができる。すなわち、どのような油脂を対象とし、何を取り除こうとしているかが決まった後は、通常の食用油脂の精製工程の脱ガム、アルカリ精製、脱色、脱臭などの操作を適宜組み合わせることによって上記アラキドン酸生産能を有するモルティエラ属の微生物を培養して得られたアラキドン酸含有油脂から、アラキドン酸含量に影響を与えず、シクロプロパン環を有するステロールや構造が解明されていない物質を含んでいる不ケン化物を除去することができる。

【0022】本発明は精製手段としてカラムクロマト法を採用する。本発明は活性アルミナ、活性炭、モレキュラーシーブズ、シリカゲル、活性白土、ケイソウ土、銀担持シリカゲルおよび／またはイオン交換樹脂を使用する。このゲルを充填剤として用いることにより、上記アラキドン酸含有油脂を精製する。すなわちこれらのゲルを充填したカラムに、上記アラキドン酸含有油脂と、展開溶媒としてヘキサン、エタノール、超臨界流体等の有機溶媒を別々に、または混合して一定の流速で流すことにより、不ケン化物と精製されたものを展開溶出させる。クロマト法としては疑似移動床法を用いることもできる。

【0023】有機溶媒を蒸留などの方法により除去した後、さらに水蒸気蒸留で処理する。すなわち、水蒸気蒸留で微量の臭いの成分や低沸点の不ケン化物まで除去することができる。またクロマト法を用いた残存する微量の有機溶媒も併せて除去することができる。アラキドン酸を含有し不ケン化物を実質的に含有しない食用油脂組成物が得られる。なおカラムクロマト法と水蒸気蒸留、超臨界流体での分別蒸留の他に、公知の精製手段を併用することができる。

【0024】本発明のアラキドン酸含有油脂は、食経験の知られていない24, 25-メチレンコレステ-5-エン-3β-オール含量が少ないため、食品成分として使用することができる。食品の種類は特に限定されないが、例えば油脂を含む食品が挙げられ、例えば、肉、魚、ナッツ等の油脂を含む天然食品、中華料理、ラーメン、スープ等の調理時に油脂を加える食品、天ぷら、フライ、油揚げ、チャーハン、ドーナツ、カリン糖等の熱媒体として油脂を用いた食品、バター、マーガリン、マヨネーズ、ドレッシング、チョコレート、即席ラーメ

ン、キャラメル、ビスケット、アイスクリーム等の油脂食品又は加工時に油脂を加えた加工食品、おかき、ハードビスケット、あんパン等の加工仕上げ時に油脂を噴霧又は塗布した食品等をあげることができる。しかし、油脂を含む食品に限定しているわけではなく、例えばパン、めん類、ごはん、菓子類、豆腐およびその加工食品などの農産食品、清酒、薬用酒などの醗酵食品、みりん、食酢、醤油、味噌、ドレッシング、ヨーグルト、ハム、ベーコン、ソーセージ、マヨネーズなどの畜産食品、かまぼこ、揚げ天、はんぺんなどの水産食品、果汁飲料、清涼飲料、スポーツ飲料、アルコール飲料、茶などの飲料等も挙げることができる。

【0025】また本発明の油脂は、食経験の知られていない24, 25-メチレンコレステ-5-エン-3β-オール含量が少なく、しかもアラキドン酸をトリグリセリドの形で豊富に含有し、エイコサペンタエン酸を含有しないか、含有しても極微量であるため、特に未熟児用調製乳、乳児用調製乳、幼児用食品、又は妊産婦用食品の原料として好ましい。

【0026】さらに本発明の油脂は、特定用保健食品を含む機能性食品（あるいは健康食品）に用いることができ、食品の形態は、一般の食品形態であっても、またカプセル、顆粒、錠剤、ドリンク剤、経腸栄養剤等の形態であってもよい。

【0027】

【実施例】本願発明の詳細を実施例で説明する。本願発明はこれら実施例によって何ら限定されるものではない。

【0028】実施例1

アラキドン酸生産菌としてモルティエラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) CBS754, 68を用い、グルコース2%、酵母エキス1%、大豆油0.2%を含む培地14001を20001培養槽に入れ、温度28℃、通気量1.0vvm、攪拌80rpm、槽内圧1.0kg/cm<sup>2</sup>Gの条件で、通気攪拌培養を開始した。流加法によりグルコース濃度を1.5%に維持し、7日間の培養後、濾過により菌体を回収し、25kgの乾燥菌体を得た。このようにして得られた乾燥菌体の1kgにヘキサン5lを加え、穏やかに30分間攪拌した。その後、吸引濾過し、濾液をロータリーエバポレーターで溶媒留去し、抽出粗油脂590gを得た。オープンカラムにシリカゲル450gを充填した。得られた抽出粗油脂590gをヘキサンで5倍に希釈し、カラムで精製後、ヘキサンを留去し、450gのカラム処理油脂を得た。該油脂をさらに水蒸気蒸留で脱臭し、抗酸化剤としてトコフェロール0.04%を加え、精製油脂を得た。

【0029】比較例1

実施例1と同様に抽出し、カラムにはかけず、水蒸気蒸留で脱臭し、これにトコフェロール0.04%を添加

し、精製油脂を得た。

【0030】〔不ケン化物含量の測定〕実施例1と比較例1で得られた精製油脂について、不ケン化物含量を下記の方法に従って測定した。結果を表1に示す。本発明において、不ケン化物含量とは、日本油化学協会の基準油脂分析試験法の不ケン化物の定量に記載された規定の方法に基づき、油脂をケン化したのち、定量に使用する溶剤にて抽出される物質より混入脂肪酸量を削除し試料に対する百分率として表したものをいう。但し、精製後に添加した例えばトコフェロールのような不ケン化物量は差し引くものとする。上記規定の方法の概略は以下の通りである（油化学、13、489（1996）参照）。

【0031】フラスコに試料約5gを取り、1N-エタノールカリ50mlを加え、穏やかに1時間沸騰しケン化させる。ケン化が終われば加熱をやめ、温水100mlでケン化用フラスコを洗いながら、ケン化液を分液漏斗に移しこれに水50mlを加えて室温になるまで冷却する。次にエチルエーテル100mlをケン化用フラスコを洗いながら分液漏斗に加え、分液漏斗に密栓して1分間激しく振り混ぜた後、明らかに2層に分かれるまで静置する。分かれた下層を第2の分液漏斗に移し、これにエチルエーテル50mlを加え、第1の分液漏斗と同様に振り混ぜた後、静置し、2層に分かれたならば、下層は第3の分液漏斗に移し、同様にエチルエーテル50mlで抽出を行う。第2、第3の分液漏斗中のエチルエーテル層は、各分液漏斗を少量のエチルエーテルで洗浄しつつ第1の分液漏斗に移し、これに水30mlを加えて振り混ぜたのち静置して2層に分け下層を除く。さらに毎回水30mlを振り混ぜては静置分別を繰り返して、分別した水がフェノールフタレイン指示薬で着色しなくなるまで洗浄する。洗浄したエチルエーテル抽出液は必要に応じて硫酸ナトリウム（無水）で脱水処理した\*

\* 後、乾燥した濾紙で濾過して蒸留フラスコに移し、なお抽出液の諸容器、濾紙などはすべて少量のエチルエーテルで洗浄してこれも蒸留フラスコに加える。蒸留フラスコのエチルエーテルを蒸留除去してその液量が50ml程度となったならば冷却し、少量のエチルエーテルでフラスコを洗いながら濃縮されたエチルエーテル抽出液をあらかじめ正しく重量のはかられた100ml丸底フラスコに移す。丸底フラスコのエチルエーテルをほとんど蒸留除去し、次にアセトン3mlを加えて前同様その大部分を蒸留除去した後、軽い減圧下（200mmHg程度）、70～80℃に30分加熱してから丸底フラスコを真空デシケーター中に移し、30分放置冷却する。丸底フラスコの重量を正しくはかり抽出物の重量を求めておく。丸底フラスコにエチルエーテル2mlと中性エタノール10mlとを加えてよく振り混ぜ、抽出物を溶解した後、フェノールフタレイン指示薬を用いN/10-エタノールカリ標準液で、混入する脂肪酸を滴定指示薬の微紅色が30秒続いたとき終点とする。

$$\text{不ケン化物含量 (\%)} = A - (B \times F \times 0.0282) / C \times 100$$

$$\text{混入する脂肪酸 (オレイン酸として、g)} = B \times F \times 0.0282$$

ただし、A = 抽出物の重量 (g)

B = N/10-エタノールカリ標準液の使用量 (ml)

C = 試料採取量 (g)

F = N/10-エタノールカリ標準液の力価

【0032】〔アラキドン酸含量の測定〕実施例1と比較例1で得られた精製油脂について、下記の方法に従って脂肪酸メチルを調製し、アラキドン酸含量をガスクロマトグラフィーで測定した。結果を表1に示す。

【0033】

【表1】

	不ケン化物含量 (%)	重金属 *	24, 25-メチレンコレステ-5-エン-3β-オール含量 (%)	アラキドン酸含量 (%)
実施例1	0.5	検出せず	0.26	38
比較例1	1	検出せず	0.51	39

\* 検出限界 0.5 ppm

#### 【0034】メチルエステルの調製

サンプル15mgを精秤し、無水エタノール-塩酸（95：5）を用いて、50℃で3時間処理することによって、メチルエステル化し、脂肪酸メチルをヘキサンで完全に抽出し、ガスクロマトグラフィーで分析した。ガスクロマトグラフィーの条件は以下の通りである。

使用カラム

液相 Advance-DS5%

担体 Chromosorb W (AW-DMCS)

粒度 80-100メッシュ

サイズ 内径3mm×2.1m

40 キャリアガス 窒素60mL/m

検出器 FID

カラム温度 190℃

検出器温度 250℃

注入口温度 240℃

【0035】〔24, 25-メチレンコレステ-5-エン-3β-オール含量の測定〕実施例1と比較例1で得られた精製油脂について、下記の方法に従って24, 25-メチレンコレステ-5-エン-3β-オール含量を測定した。結果を表1に示す。まず、ステロール組成成分分析法を説明する。原料油脂を30～80mg、栓付き試

50



験管内に秤量し、メタノール4ml及び33%水酸化カリウム水溶液1mlを添加し栓をする。これで80℃で緩く攪拌しながら1時間反応させた後、放冷し、脂溶成分をヘキサンで抽出する。得られたヘキサン溶液をフェノールフタレイン指示薬が水層に着色しなくなるまで水洗し、減圧濃縮により分析サンプルを得る。分析サンプルを少量のヘキサンに溶解し、以下に示す条件のガスクロマトグラフィーに供する。市販のコレステロールを内部標準に用い、FID検出面積/検出重量比が全てのステロールで同じとの前提に基づいて、原料油脂に対する重量比を求めた値を24, 25-メチレンコレスト-5-エン-3β-オール含量とする。

ガスクロマトグラフィーの分析条件

使用カラム ULBON HR-1 (内径0.25mm、長さ25m)

カラム温度 280℃

注入口及び検出器温度 300℃

キャリアガス及びゲージ圧力 ヘリウム 1.2kg/cm<sup>2</sup>

メイクアップガス及び流量 窒素 70ml/min 20

検出器 FID

スプリット比: 20

【0036】実施例2

\* 【表2】

菌株		不ケン化物含量 (%)	24,25-メチレンコレスト-5-エン-3β-オール含量 (%)	アラキドン酸含量 (%)
M. alpina CBS527.72	実施例	0.6	0.22	33
M. alpina CBS527.72	比較例	1.6	0.62	33
M. alpina ATCC42430	実施例	0.3	0.11	26
M. alpina ATCC42430	比較例	0.9	0.33	27
M. hygrophila IFO5941	実施例	0.5	0.15	23
M. hygrophila IFO5941	比較例	1.6	0.52	22
M. elongata IFO8570	実施例	0.4	0.23	21
M. elongata IFO8570	比較例	1	0.58	21

【0038】実施例3

アラキドン酸生産菌としてモルティエラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) CBS754.68を用い、グルコース2%、酵母エキス1%、大豆油0.1%を含む培地14001を20001培養槽に入れ、温度24℃、通気量0.5vvm、攪拌100

50

\* アラキドン酸生産菌としてモルティエラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) CBS527.72、モルティエラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) ATCC42430、モルティエラ・ヒグロフィラ (*Mortierella hygrophila*) IFO5941、モルティエラ・エロンガタ (*Mortierella elongata*) IFO8570を用い、それぞれ培養を行った。グルコース4%、酵母エキス1%、大豆油0.2%を含む培地6001を10001培養槽に入れ、温度28℃、通気量1.0vvm、攪拌100rpm、槽内圧0.5kg/cm<sup>2</sup>Gの条件で、7日間の通気攪拌培養を行い、濾過、乾燥により乾燥菌体を回収した。得られた乾燥菌体に対して、実施例1及び比較例1と同様の処理を行い、得られた精製油脂の不ケン化物含量、24, 25-メチレンコレスト-5-エン-3β-オール含量、アラキドン酸含量を測定した。結果を表2に示す。カラム処理を行うことによって、アラキドン酸含量に影響を及ぼすことなく、不ケン化物含量及び24, 25-メチレンコレスト-5-エン-3β-オール含量の少ない精製品を得ることができた。

【0037】

\* 【表2】

rpm、槽内圧1.0kg/cm<sup>2</sup>Gの条件で、通気攪拌培養を開始した。流加法によりグルコース濃度を1.5%に維持し、9日間の培養後、濾過により菌体を回収し、20kgの乾燥菌体を得た。このようにして得られた乾燥菌体の3kgにヘキサン15lを加え、穏やかに30分間攪拌した。その後、吸引濾過し、濾液をロータ



リーエバポレーターで溶媒留去し、抽出粗油脂1800gを得た。得られた抽出粗油脂1000gに対して実施例1と同様のカラム処理を行い、900gのカラム処理油脂を得た。得られたカラム処理油脂の500g、及び抽出粗油脂800gに対しては、不ケン化物を蒸留処理した。このようにして得られたカラム処理油脂、蒸留処理油脂、カラム及び蒸留処理油脂を、それぞれ水蒸気蒸留で脱臭し、抗酸化剤としてトコフェノール0.04%を加えた。得られた精製油脂の不ケン化物含量、24、\*

\*25-メチレンコレスト-5-エン-3β-オール含量、アラキドン酸含量を測定した。結果を表3に示す。カラム処理及び/又は蒸留処理を行うことによって、アラキドン酸含量に影響を及ぼすことなく、不ケン化物含量及び24、25-メチレンコレスト-5-エン-3β-オール含量の少ない精製品を得ることができた。

【0039】

【表3】

処理方法	不ケン化物含量 (%)	24,25-メチレンコレスト-5-エン-3β-オール 含量 (%)	アラキドン酸含量 (%)
カラム処理→脱臭	0.38	0.14	42
蒸溜→脱臭	0.4	0.15	41
カラム処理→蒸溜→脱臭	0.36	0.13	43

【0040】実施例4

大豆タンパク（商品名：エスサンミート、味の素（株）製）1%を酵母エキスに代わる培地成分として用いて実施例1、比較例1と同様の方法で培養し、得られた菌体より、実施例1、比較例1と同様の処理を行い、得られ

※た油脂について、不ケン化物含量、24、25メチレンコレスト-5-エン-3β-オール含量、アラキドン酸含量を測定した。結果を表4に示す。

【0041】

【表4】

	不ケン化物含量	24,25-メチレンコレスト-5-エン-3β-オール 含量	アラキドン酸含量
実施例4	0.5%	0.09%	37%
比較例4	1.1%	0.20%	37%

【0042】実施例5

アラキドン酸生産菌としてモルティエラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) ATCC 32221を用い培養を行った。グルコース4%、脱脂大豆粉1.2%、リン酸水素カリウム0.2%、大豆油0.1%を含む培地25Lを50L培養槽に入れ、温度28℃、通気量1.0vvm、攪拌300rpm、槽内圧1.0kg/cm<sup>2</sup>Gの条件で5日間の通気攪拌培養

★を行い、濾過、乾燥によりアラキドン酸含有菌体を回収した。得られた菌体により、実施例1、比較例1と同様の処理を行い、得られた油脂について、不ケン化物含量、24、25メチレンコレスト-5-エン-3β-オール含量、アラキドン酸含量を測定した。結果を表5に示す。

【0043】

【表5】

	不ケン化物含量	24,25-メチレンコレスト-5-エン-3β-オール 含量	アラキドン酸含量
実施例5	0.5%	0.02%	25%
比較例5	0.9%	0.05%	25%

フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>5</sup>

C12R 1:645)

識別記号

F I

(72)発明者 土居崎 信滋

八王子市北野町559-6 日本水産株式会社  
社中央研究所内

(72)発明者 降旗 清代美

八王子市北野町559-6 日本水産株式会社  
社中央研究所内

【公報種別】 特許法第17条の2の規定による補正の掲載  
 【部門区分】 第1部門第1区分  
 【発行日】 平成16年10月14日(2004.10.14)

【公開番号】 特開平10-191886  
 【公開日】 平成10年7月28日(1998.7.28)  
 【出願番号】 特願平8-289172  
 【国際特許分類第7版】

A 2 3 D 9/007  
 A 2 3 C 9/152  
 A 2 3 L 1/30  
 C 1 2 P 7/64  
 //(C 1 2 P 7/64  
 C 1 2 R 1:645 )

【F I】

A 2 3 D 9/00 5 1 6  
 A 2 3 C 9/152  
 A 2 3 L 1/30 Z  
 C 1 2 P 7/64  
 C 1 2 P 7/64  
 C 1 2 R 1:645

【手続補正書】  
 【提出日】 平成15年10月3日(2003.10.3)  
 【手続補正1】  
 【補正対象書類名】 明細書  
 【補正対象項目名】 0010  
 【補正方法】 変更  
 【補正の内容】  
 【0010】

本発明の食用油脂の製造に使用する微生物は、モルティエレラ (Mortierella) 属のモルティエレラ亜属に属し、アラキドン酸生産能を有する微生物であれば、すべて使用することができる。このような微生物としては、例えばモルティエレラ・エロンガタ (Mortierella elongata) IFO 8570、モルティエレラ・エキシグア (Mortierella exigua) IFO 8571、モルティエレラ・フィグロフィラ (Mortierella hygrophila) IFO5941、モルティエレラ・アルピナ (Mortierella alpina) IFO 8568、ATCC 16266、ATCC 32221、ATCC42430、CBS 219・35、CBS 224・37、CBS 250・53、CBS 343・66、CBS 527・72、CBS 529・72、CBS 528・72、CBS 608・70、CBS 754・68等を挙げることができる。これらの菌株はいずれも、大阪市の財団法人醗酵研究所 (IFO)、及び米国アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション [American Type Culture Collection (ATCC)] 及び Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) からなんら制限なく入手することができる。また、本発明者らが土壌から分離した菌株 モルティエレラ・エロンガタ SAM 0219 (微工研菌寄第8703号) (微工研条寄第1239号) を使用することもできる。これらのタイプカルチャーに属する菌株、あるいは自然界から分離した菌株は、そのまま用いることができるが、増殖及び／又は単離を1回以上行うことによって得られる元の菌株とは性質の異なる自然変異株を用いることもできる。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0034

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0034】

メチルエステルの調製

サンプル15mgを精秤し、無水メタノール-塩酸(95:5)を用いて、50℃で3時間処理することによって、メチルエステル化し、脂肪酸メチルをヘキサンで完全に抽出し、ガスクロマトグラフィーで分析した。ガスクロマトグラフィーの条件は以下の通りである。

使用カラム

液相 Advance-DS5%

担体 Chromosorb W (AW-DMCS)

粒度 80-100メッシュ

サイズ 内径3mm×2.1m

キャリアガス 窒素60mL/m

検出器 FID

カラム温度 190℃

検出器温度 250℃

注入口温度 240℃

(19)



(11)

**EP 1 894 472 A1**

(12)

**EUROPEAN PATENT APPLICATION**

(43) Date of publication:

05.03.2008 Bulletin 2008/10

(51) Int Cl.:

A23D 9/007 (2006.01)

(21) Application number: 07118999.7

(22) Date of filing: 09.10.1997

(84) Designated Contracting States:

AT BE CH DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC  
NL PT SE

(30) Priority: 11.10.1996 JP 28917296

(62) Document number(s) of the earlier application(s) in  
accordance with Art. 76 EPC:

97943165.7 / 0 956 774

(71) Applicants:

- SUNTORY LIMITED  
Osaka-shi,  
Osaka 530-0004 (JP)
- NIPPON SUISAN KAISHA, LTD.  
Tokyo 100-0004 (JP)

(72) Inventors:

- HIGASHIYAMA, Kenichi  
Mishima-gun Tokyo 618-0001 (JP)

• AKIMOTO, Kengo

Mishima-gun Osaka 618-0001 (JP)

• SHIMIZU, Sakayu

Kyoto-shi Kyoto 616-8212 (JP)

• DOISAKI, Nobushige

c/o NIPPON SUISAN KAISHA LTD.

Hachioji-shi Tokyo 192-0906 (JP)

• FURIHATA, Kiyomi

c/o NIPPON SUISAN KAISHA LTD.

Hachioji-shi Tokyo 192-0906 (JP)

(74) Representative: TBK-Patent

Bavariaring 4-6

80336 München (DE)

Remarks:

This application was filed on 22-10-2007 as a  
divisional application to the application mentioned  
under INID code 62.

(54) **Edible oil containing arachidonic acid and foods containing the same**

(57) Edible oil containing arachidonic acid obtained from microorganisms belonging to the subgenus *Mortierella* of the genus *Mortierella* and being capable of producing arachidonic acid are provided. The oil contain little unsaponifiable matters and, above all, the smallest possible amount of sterol with cyclopropane structure which have not been recognized as food components, and are suitable for the production of foods, in particular, infant formula.

Arachidonic acid-containing edible oil originating in microorganisms containing not more than 0.8% by weight, preferably not more than 0.6% by weight of unsaponifiable matters and 20% by weight or more of ara-

chidonic acid. Further, these edible oil contain not more than 0.3% by weight, preferably not more than 0.15% by weight of 24,25-methylenecholest-5-en-3 $\beta$ -ol. The microorganisms are those belonging to the subgenus *Mortierella* of the genus *Mortierella* and being capable of producing arachidonic acid. These microorganisms belong to the species *alpina* of the genus *Mortierella*. Foods including the arachidonic acid-containing edible oil. Formula for premature infants, formula for infants, foods for infants, and foods for pregnant women and nursing mothers, including the arachidonic acid-containing edible oil.

EP 1 894 472 A1

## Description

## TECHNICAL FIELD

[0001] This invention relates to edible oil that contains arachidonic acid obtained from microorganisms belonging to the subgenus *Mortierella* of the genus *Mortierella* and being capable of producing arachidonic acid, but contains little unsaponifiable matters. This invention also relates to foods containing the arachidonic acid-containing edible oil, in particular, infant formula.

[0002] In this invention, "unsaponifiable matters" means that originating in microorganisms. Therefore the term "unsaponifiable matters" in this description indicates only that originating in microorganisms and being free of that added artificially.

## BACKGROUND ART

[0003] Arachidonic acid has attracted attention as a precursor of prostaglandins, thromboxane, prostacyclin, leucotrienes, etc. which have potent and various physiological actions including uterine muscle contraction, relaxation, vasodilatation, and antihypertensive action. Along with DHA (docosahexaenoic acid), it has extensively and intensively been investigated particularly as a substance essential for growth of infants. For example, Lanting et al. followed up the growth of infants until the age of 9 years who had been fed with mother's milk or milk powder for infants for more than 3 weeks after birth, investigated the incidence of minor impairments in the cranial nerve in these infants based on their behavior, etc. and found that the incidence of encephalopathy in the infants fed with milk powder for infants was about twice as high as that in those fed with mother's milk [LANCET, Vol.344, 1319-1322 (1994)]. This shocking fact is supposed to have been due to the lack of long-chain unsaturated fatty acids such as DHA and arachidonic acid in milk powder for infants while these acids are present in mother's milk, which acids may play an important role in development of the brain. Many studies have been done to make milk powder for infants resemble as closely as possible to mother's milk, the ideal nutrition for infants, though these studies have concentrated on elucidation of the relationship between the basic nutrients, vitamins, minerals, etc. present in mother's milk and the infection-preventing action of mother's milk. Lately the influence of long-chain polyunsaturated fatty acids on the brain has also become of interest. Further, reports indicating that long-chain unsaturated fatty acids may play a role in development of the brain and the retina of newborns have recently been published one after another. This raises topics attracting attentions in the field of nutrition of premature infants and newborns. Thus it has been desired to develop oil containing arachidonic acid abundantly and being safely usable as ingredients of foods, in particular, infant formula.

[0004] Arachidonic acid occurs widely in the animal kingdoms, and has been isolated from lipids extracted from the adrenal gland and the liver of animals. However, because such organs contain the acid only a little and a large amount of the organs are hardly obtainable, isolation from these organs is insufficient for supply of arachidonic acid. Methods have been proposed to produce arachidonic acid by cultivation of various microorganisms capable of producing arachidonic acid. Among them those belonging to the genus *Mortierella* have been known to produce oil with a high content of arachidonic acid (Japanese Published Unexamined Patent Application No.44891/88 and No.12290/88). Although the oil thus produced are said to be highly safe, it is not widely accepted because of its originating in microorganisms. The oil obtained by cultivation of the microorganisms belonging to the species *Mortierella alpina* comprises mainly triglycerides (about 70 % by weight or more) and phospholipids together with unsaponifiable matters including desmosterol. It is confirmed that sterol with cyclopropane structure which have never been known to occur in nature, in the concrete, 24,25-methylenecholest-5-en-3  $\beta$  -ol are contained among the unsaponifiable matters [LIPIDS, Vol. 27, No.6, 481-483 (1992)], though all of the composition of the unsaponifiable matters in the oil is not known.

## DISCLOSURE OF THE INVENTION

[0005] The inventors thought it desirable at present to remove as far as possible those substances, which have not been recognized as food components or of which structures remain unknown, from the arachidonic acid-containing oil obtained by cultivation of microorganisms belonging to the subgenus *Mortierella* of the genus *Mortierella*. Therefore this invention intends to provide edible oil containing arachidonic acid originating in microorganisms belonging to the subgenus *Mortierella* of the genus *Mortierella*, containing little unsaponifiable matters and, above all, the smallest possible amount of sterol with cyclopropane structure which have never been eaten, and being suitable for production of foods, in particular, infant formula.

[0006] The inventors have found it possible to reduce the content of 24,25-methylenecholest-5-en-3  $\beta$  -ol in the arachidonic acid-containing oil obtained from the culture of arachidonic acid-producing microorganisms belonging to the genus *Mortierella* by controlling the conditions of cultivation. This finding has given the inventors a new purpose for production of arachidonic acid-containing oil with a smallest possible amount of substances which have not been rec-

ognized as food components or of which structures remain unknown. Then the inventors have found, as the result of many researches to achieve the above purpose, that it is possible to reduce the content of unsaponifiable matters and the substances including sterol with cyclopropane structure which have not been recognized as food components or of which structures remain unknown without any influence on the content of arachidonic acid, by cultivating arachidonic acid-producing microorganisms belonging to the subgenus *Mortierella* of the genus *Mortierella* in nutrient medium according to the conventional method, collecting the microbes, recovering oil abundant in arachidonic acid from the microbes, and refining the oil by an appropriate combination of conventional processes for edible oils and fats, such as degumming, treatment with alkali, bleaching, deodorization, etc. Eventually the inventors have completed this invention.

[0007] Hence this invention relates to arachidonic acid-containing edible oil originating in microorganisms which contain not more than 0.8 % by weight of unsaponifiable matters and 20 % by weight or more of arachidonic acid.

[0008] In addition, this invention relates to arachidonic acid-containing edible oil originating in microorganisms which contain not more than 0.6 % by weight of unsaponifiable matters and 20 % by weight or more of arachidonic acid.

[0009] Further, this invention relates to arachidonic acid-containing edible oil originating in microorganisms which contain not more than 0.8 % by weight, preferably not more than 0.6 % by weight, of unsaponifiable matters, 20 % by weight or more of arachidonic acid, and not more than 0.3 % by weight, preferably not more than 0.15 % by weight, of 24,25-methylenecholest-5-en-3  $\beta$  -ol.

[0010] Furthermore, this invention relates to foods such as formula for premature infants, infant formula, foods for infants, and foods for pregnant women and nursing mothers, containing any of the above-mentioned edible oil.

[0011] The oil of this invention are oil of microorganisms origin obtained from the culture after cultivation of arachidonic acid-producing microorganisms belonging to the subgenus *Mortierella* of the genus *Mortierella*, containing not more than 0.8 % by weight, preferably not more than 0.6 % by weight, more preferably not more than 0.5 % by weight, of unsaponifiable matters based on the weight of the oil, and 20 % by weight or more, preferably 30 % by weight or more, more preferably 35 % by weight or more, of arachidonic acid based on the weight of the total fatty acid in the oil.

[0012] It is preferable that the oil of this invention contain not more than 0.3 % by weight, preferably not more than 0.15 % by weight, more preferably not more than 0.04 % by weight, of 24,25-methylenecholest-5-en-3  $\beta$  -ol.

[0013] It is also preferable that the oil of this invention contain 70 % by weight or more, preferably 90 % by weight or more, more preferably 92 % by weight or more, of triglycerides in the oil.

[0014] It is preferable that the oil of this invention contain not more than 0.1 % of moisture, have the acid value of 0.5 or less and peroxide value of 5 or less, show a color of 50 or less of yellow and 10 or less of red as determined in a 133.4 mm cell by the Rovibond's method, and contain 0.2 to 0.7 % myristic acid, 10 to 16 % of palmitic acid, 4 to 10 % of stearic acid, 5 to 15 % of oleic acid, 5 to 15 % of linoleic acid, 1 to 5 % of  $\gamma$ -linolenic acid, 0.1 to 2 % of  $\alpha$ -linolenic acid, 1 to 6 % of dihomo- $\gamma$ -linolenic acid, 0 to 1 % of eicosapentaenoic acid, and 2 to 7 % of lignoceric acid.

[0015] The microorganisms used for production of the oil of this invention belong to the subgenus *Mortierella* of the genus *Mortierella*, and any of those may be used as far as they are able to produce arachidonic acid. The microorganisms are exemplified by *Mortierella elongata* IFO 8570, *Mortierella exigua* IFO 8571, *Mortierella hygrophila* IFO 5941, *Mortierella alpina* IFO 8568, ATCC 16266, ATCC 32221, ATCC 42430, CBS 219.35, CBS 224.37, CBS 250.53, CBS 343.66, CBS 527.72, CBS 529.72, CBS 528.72, CBS 608.70, CBS 754.68, and the like. These strains are available without any limitation from the Foundation Institute of Fermentation in Osaka (IFO), American Type Culture Collection (ATCC), and Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS). Also the strain isolated by the inventors from soil, *Mortierella elongata* SAM 0219 [National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry, 1-3, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaragi-ken, Japan, deposited on March 19, 1986, Accession No. FERM BP-1239] may be used. The strains belonging to these type cultures or isolated from the natural world are usable as they are, and spontaneous variants may be used which are obtained by one or more repetitions of growth and/or isolation of the original strains and have different properties from those of the original strains.

[0016] The microorganisms used in this invention also include the variants and recombinants of the arachidonic acid-producing microorganisms belonging to the subgenus *Mortierella* of the genus *Mortierella* (wild strains), i.e. those designed so that the content of arachidonic acid in the oil may be increased and/or the content of the total oil may be increased over that produced by the microorganisms of the original wild strain when cultivated by using the same substrates. The microorganisms of this invention further include those designed so that they may utilize efficiently the substrates with high cost-benefit ratios to produce arachidonic acid as much as obtainable with the corresponding wild strains.

[0017] Microorganisms capable of producing arachidonic acid can be cultivated according to the conventional methods. For example, the spore, mycelium, or preculture obtained by preliminary cultivation of the microorganism strain is inoculated into a common liquid or solid medium followed by cultivation. When a liquid medium is used, common carbon sources including glucose, fructose, xylose, saccharose, maltose, soluble starch, refinery molasses, glycerol, mannitol, citric acid, and corn starch may be used, among which glucose, fructose, maltose, glycerol, citric acid, and corn starch are particularly preferable. Usable nitrogen sources are organic nitrogen sources such as peptone, yeast extract, malt extract, meat extract, casamino acids, corn steep liquor, and urea, and inorganic nitrogen sources such as sodium

nitrate, ammonium nitrate, and ammonium sulfate.

[0018] Use of a nutrient source derived from soybean as the nitrogen source can reduce the content of 24,25-methylenecholest-5-en-3  $\beta$  -ol in the oil (the ratio based on the total sterol in the oil). It is preferable that the nitrogen source obtained from soybean, being usable in this invention, contains 2 % or more, preferably 3 % or more, more preferably 5 % or more, of nitrogen based on the ingredients other than moisture. Usable nitrogen sources from soybean include defatted soybean without any further treatment or after processing such as heat treatment; acid treatment; alkali treatment; enzyme treatment; chemical modification; denaturation and/or renaturation by chemical and/or physical treatments including heat treatment, acid treatment, alkali treatment, enzyme treatment, chemical modification, etc.; removal of some ingredients by use of water and/or organic solvents; removal of some ingredients by filtration and/or centrifugation; freezing; pulverization; drying; sieving, etc., or non-defatted soybean after similar processing. These nitrogen sources may be used solely or in combination of a few of them. Common sources are soybean, defatted soybean, soybean flakes, soybean protein for foods, bean curd refuse, soy-milk, roasted and ground soybean, etc. of which heat-denatured defatted soybean is desirable, and it is more desirable to use defatted soybean after heat-denaturation followed by removal of ethanol-soluble ingredients.

[0019] In addition, inorganic salts such as phosphates, calcium chloride, magnesium chloride, magnesium sulfate, iron sulfate, copper sulfate, and sodium sulfate, and vitamins may be used as trace nutrients if necessary. These nutrients in the medium are not particularly restricted as far as each of them is contained at such a concentration that does not inhibit the growth of the microorganism. For practical purposes, the preferred concentration of the carbon source is 0.1 to 30 % by weight, preferably 0.5 to 15 % by weight, more preferably 1 to 15 % by weight, while the preferred concentration of the nitrogen source is 0.01 to 10 % by weight, preferably 0.1 to 5 % by weight. Spinner culture with aeration and agitation, shaking culture, or standing culture is performed at temperatures of 5 to 40°C, preferably 20 to 30°C, in a medium of pH 4 to 10, preferably 5 to 8, usually for 2 to 20 days.

[0020] When a solid medium is used, wheat bran, hull chaff, rice bran, or the like to which 50 to 100 % by weight of water has been added is used for incubation at temperatures of 5 to 40 °C, preferably 20 to 30 °C, for 3 to 20 days.

Nitrogen sources, inorganic salts, and/or trace nutrients may be added to the medium as needed.

[0021] For increasing the amount of arachidonic acid produced, a hydrocarbon such as hexadecane or octadecane; a fatty acid such as oleic acid or linoleic acid or a salt thereof such as sodium or potassium salt, or a fatty acid ester such as ethyl ester, sorbitan fatty acid ester, glycerol fatty acid ester; or oils and fats such as olive oil, cotton seed oil, or coconut oil, may be added solely or in combination as a precursor of arachidonic acid. These additives may be added at a time, or continuously, or at several times in lots. Hydrocarbons, fatty acids or the salts thereof, or oils and fats are desirable when added before the start of culturing, while fatty acids or the salts thereof, or fatty acid esters, or oils and fats are desirable when added during cultivation.

[0022] After cultivation under above-mentioned conditions, the arachidonic acid-containing lipid is produced and accumulated within the microbes. When a liquid culture medium was used, the arachidonic acid-containing lipid is recovered from the microbes as follows:

After culturing is complete, the microbes are collected from the culture medium by conventional solid-liquid separation means such as centrifugation and/or filtration, etc. The microbes thus collected are preferably washed with water, destroyed, and dried. The microbes are dried by freeze-drying, drying in air, etc. Dried microbes are subjected to extraction with an organic solvent preferably under nitrogen flow. Usable organic solvents include ether, hexane, methanol, ethanol, chloroform, dichloromethane, petroleum ether, etc. Alternate extraction with methanol and petroleum ether, and extraction with a one-layer solvent system consisting of chloroform, methanol, and water are also able to attain a good result. Evaporation of the organic solvent from the extract under reduced pressure gives an oil containing arachidonic acid at a high concentration.

[0023] Instead of the above-mentioned methods, wet microbes may be used for extraction. Solvents usable in this case include those that are soluble in water, such as methanol, ethanol, and the like, and water-soluble mixtures containing these solvents and water and/or other solvents. Other procedures are the same as mentioned above.

[0024] The arachidonic acid-containing lipid thus obtained contains mostly triglycerides (about 70 % by weight or more) and phospholipids (about not more than 30 % by weight), and in addition, unsaponifiable matters including desmosterol. The unsaponifiable matters contain substances of which structures remain unknown or which have not been recognized as food components, for example, sterol with cyclopropane structure which have not been recognized as food components, specifically, 24,25-methylenecholest-5-en-3  $\beta$  -ol.

[0025] The oil of this invention can be produced by refining the arachidonic acid-containing oil obtained by cultivation of the above-mentioned arachidonic acid-producing microorganisms belonging to the subgenus *Mortierella* of the genus *Mortierella*. That is, once the type of fats to be treated and the substances to be removed have been decided, the unsaponifiable matters containing sterol with cyclopropane structure and substances of which structures remain unknown can be removed with an appropriate combination of common methods for refining of edible oils and fats, such as



degumming, refining with alkali, bleaching, deodorization, etc., without any influence on the content of arachidonic acid, from the arachidonic acid-containing oil obtained by cultivation of the above-mentioned microorganisms belonging to the genus *Mortierella* and being capable producing arachidonic acid.

[0026] For refining, column chromatography is employed in this invention. Activated alumina, active carbon, molecular sieves, silica gel, activated clay, diatomaceous earth, silver-silica gel, and/or ion exchange resins are used in this invention. The above-mentioned arachidonic acid-containing oil are refined by using the gel as the packing material. Namely, the above-mentioned arachidonic acid-containing oil and an organic solvent such as hexane, ethanol, supercritical fluid, etc., which is used as a developer, are forced to flow solely or as a mixture thereof at a constant rate through the column packed with the gel so that unsaponifiable matters and the refined oil may be developed and eluted. Chromatography may be performed by the Simulated moving bed chromatography.

[0027] After removal of the organic solvent by distillation, etc., the residue is treated further with steam distillation. Namely, steam distillation can remove even trace volatile flavor compounds and unsaponifiable matters having the low boiling points. Also a trace amount of the remaining organic solvent left behind after the chromatographic process can be eliminated at the same time. Thus an edible oil composition that contains arachidonic acid and is essentially free of unsaponifiable matters is obtained. Column chromatography may be combined with another well-known method for refining, in addition to steam distillation or fractional distillation with a supercritical fluid.

[0028] Because of the low content of 24,25-methylenecholest-5-en-3  $\beta$  -ol that has not been recognized as food component, the arachidonic acid-containing oil of this invention can be used as an ingredient of foods. The type of foods is not particularly restricted, being exemplified by foods containing oils and fats, including natural foods containing oils and fats, such as meat, fish, and nuts; foods to which oils and fats are added during cooking, such as Chinese dishes, Chinese noodle, soup, etc.; foods which use oils and fats as the heat transfer medium, such as *tempura*, fry, fried bean curd, Chinese dish of fried rice, doughnuts, fried dough cakes, etc.; fatty foods and processed foods with oils and fats added during processing, such as butter, margarine, mayonnaise, dressing sauce, chocolate, instant Chinese noodle, caramel, biscuit, ice cream, etc.; and foods with oils and fats sprayed or applied during finishing, such as fried rice cake, hard biscuit, bean jam bun, etc. However foods are not restricted to those containing oils and fats, but agricultural foods such as bread, noodles, rice, confectionery, soybean curd and processed soybean curd; fermentation foods such as *sake*, medical *sake*, sweat *sake* (*mirin*), vinegar, *miso*, dressing, etc.; live-stock foods such as yoghurt, ham, bacon, sausage, mayonnaise, etc.; fishery foods such as fish paste, fried fish paste, fish paste containing grated yam; drinks such as fruit juice, fresh drinks, sports drinks, alcoholic drinks, tea, etc. may be included.

[0029] The oil of this invention are preferable as raw materials especially for formula for premature infants, formula for infants, foods for infants, and foods for pregnant women and nursing mothers, because the oil contain a low content of 24,25-methylenecholest-5-en-3  $\beta$  -ol which has not been recognized as food component, are rich in arachidonic acid in the form of a triglyceride, and are free of eicosapentaenoic acid or, even if so, contain only a trace amount of the acid.

[0030] Further, the oil of this invention may be used in functional foods including health foods for specified use (or health foods), and the form of these foods may be general ones, or capsules, granules, tablets, drinks, or enteric feeding forms.

#### BEST MODE FOR CARRYING OUT THE INVENTION

[0031] This invention will now be explained in more detail with reference to the following Examples. It should be noted that this invention is not limited at all by these Examples.

#### Inventive Example 1

[0032] *Mortierella alpina* CBS754.68 as the arachidonic acid-producing microorganism was inoculated in a 2000-l culture tank with 1400 l of culture medium containing 2 % of glucose, 1 % of yeast extract, and 0.2 % soybean oil, and culture with aeration and agitation was started at 28 °C with aeration at 1.0 vvm, agitation rate at 80 rpm, and the internal pressure of the tank of 1.0 kg/cm<sup>2</sup>G. The concentration of glucose was maintained at 1.5 % by the fed-batch system, and the microbes were collected by filtration after 7-day cultivation, to give 25 kg of dried microbes. Then 5 l of hexane was added to 1 kg of the dried microbes thus obtained, and the mixture was gently stirred for 30 minutes. Thereafter the filtrate obtained by suction filtration was subjected to evaporation in a rotary evaporator to remove the solvent, to give 590 g of a crude oil extract.

[0033] An open column was packed with 450 g of silica gel. The crude oil extract, 590 g, was diluted five times with hexane, and refined through the column, followed by evaporation of hexane, to give 450 g of a column-treated oil. The oil was subjected further to steam distillation for deodorization, followed by addition of 0.04 % of tocopherol as an anti-oxidizing agent, to give a refined oil.

## Comparative Example 1

[0034] Extraction was performed in the same manner as described in Example 1, but the extract was not treated with the column, followed by steam distillation for deodorization, to give a refined oil after addition of 0.04 % of tocopherol.

[Quantification of unsaponifiable matters]

[0035] The refined oil obtained in Inventive Example 1 and that in Comparative Example 1 were each analyzed for the content of unsaponifiable matters by the following method. The results are shown in Table 1.

[0036] In this invention, the content of unsaponifiable matters means the residual amount after subtraction of the amount of contaminated fatty acids from the amount of the substance extracted with a solvent used in quantitative analysis after saponification of the oil in accordance with the method for quantification of unsaponifiable matters, which is specified in the Standard Methods for the Analysis of Fats, Oils and Related Materials by Japan Oil Chemists' Society, the residual amount being expressed by the percentage to the amount of the sample. The amount of the Unsaponifiable Matter added after refining, such as tocopherol, should be subtracted.

[0037] The above specified method will be outlined below (see "YUKAGAKU (Oil Chemistry)", Journal of Japan Oil Chemists' Society, 13, 489 (1996)):

Weigh about 5 g of a sample in a flask, add 50 ml of 1N-ethanolic potassium hydroxide, and boil gently for 1 hour for saponification. Stop heating when saponification has completed, transfer the liquid after saponification into a separating funnel together with the washing of the saponification flask with 100 ml of warm water, add 50 ml of water, and allow the mixture to cool to the room temperature. Add 100 ml of ethyl ether to the separating funnel while washing the saponification flask with the ethyl ether, stopper tightly the funnel, shake vigorously for 1 minute, and stand it still until two layers are separated clearly. Transfer the lower layer into a second separating funnel, add 50 ml of ethyl ether, shake as did with the first funnel, stand it still, transfer the lower layer into a third funnel after separation into two layers, and repeat extraction similarly with 50 ml of ethyl ether.

[0038] Transfer the ethyl ether layers in the second and the third funnels into the first funnel while washing those funnels with a small amount of ethyl ether, add 30 ml of water, shake and then stand it still for separation into two layers, and remove the lower layer. Repeat the process of shaking and standing-still for fractionation with 30 ml of water added each time, and wash the extracts until the fractionated water no longer shows color with the phenolphthalein indicator. Dehydrate the washed ethyl ether extract with sodium sulfate (anhydrous) as needed, filtrate it through a dry filter paper, transfer the filtrate into a distillation flask. The containers, the filter papers, etc. used for extraction are each washed with a small amount of ethyl ether, and the washings are all added to the distillation flask. Remove ethyl ether in the distillation flask by distillation, cool when the volume has become about 50 ml, and transfer the concentrated ethyl ether extract into an accurately weighed 100-ml round bottomed flask together with the washing of the distillation flask with a small amount of ethyl ether.

[0039] Distillate off almost completely ethyl ether in the round bottomed flask, add 3 ml of acetone, most of which is distilled off similarly as in the preceding process, heat the extract to 70 to 80°C for 30 minutes under a slightly reduced pressure (about 200 mmHg), place the round bottomed flask into a vacuum desiccator, and stand it still for 30 minutes for cooling. Weigh accurately the round bottomed flask to calculate the weight of the extract.

[0040] Add and mix by shaking 2 ml of ethyl ether and 10 ml of neutral ethanol in the round bottomed flask to dissolve the extract, and determine the amount of contaminated fatty acids by titration with the N/10 ethanolic potassium hydroxide standard solution using the phenolphthalein indicator, wherein the endpoint is the pale red color of the indicator kept unchanged for 30 seconds.

Unsaponifiable matters content (%)

$$= \{A - (B \times F \times 0.0282)\} / C \times 100$$

Contaminated fatty acids (on the oleic acid basis, g)

$$= B \times F \times 0.0282$$

wherein A = weight of the extract (g)

B = amount of N/10-ethanolic potassium hydroxide standard solution used (ml)

C = amount of the sample (g)

F = titer of N/10-ethanolic potassium hydroxide standard solution

[Quantification of arachidonic acid]

[0041] The refined oil preparations obtained in Inventive Example 1 and Comparative Example 1 were used for preparation of fatty acid methyl esters in accordance with the method described below, and the esters were subjected to gas chromatography for determination of the content of arachidonic acid. The results are shown in Table 1.

Table 1

	Unsaponifiable matters content (%)	*heavy metals	24,25-methylenecholest-5-en-3 $\beta$ -ol content (%)	Arachidonic acid content (%)
Inventive Example 1	0.5	Not detected	0.26	38
Comparative Example 1	1	Not detected	0.51	39
*detection limit: 0.5ppm				

Preparation of methyl esters

[0042] 15 mg of the sample was weighed precisely, and converted into methyl esters by treatment with absolute methanol-hydrochloric acid (95:5) at 50°C for 3 hours. The resultant fatty acid methyl esters were extracted completely with hexane, and subjected to gas chromatography under the following conditions.

Column

Liquid phase: Advance-DS 5 %

Support: Chromosorb W (AW-DMCS)

Grain size: 80 to 100 mesh

Size: inner diameter 3 mm  $\times$  2.1 m

Carrier gas: nitrogen 60 mL/m

Detector: FID

Column temperature: 190°C

Detector temperature: 250°C

Injection port temperature: 240°C

[Quantification of 24,25-methylenecholest-5-en-3  $\beta$  -ol]

[0043] The refined oil preparations obtained in Inventive Example 1 and Comparative Example 1 were subjected to quantification of 24,25-methylenecholest-5-en-3  $\beta$  -ol. The results are shown in Table 1.

[0044] First, the process for sterol composition analysis is explained: Weigh 30 to 80 mg of the starting oil into a test tube with a stopper, add 4 ml of methanol and 1 ml of 33 % aqueous solution of potassium hydroxide, and close the tube with the stopper. Allow the mixture to react with gentle stirring at 80°C for 1 hour, allow it to stand for cooling, and extract fat-soluble components with hexane. Wash the resultant hexane solution with water until the aqueous layer no longer shows color with the phenolphthalein indicator, and concentrate the solution under reduced pressure to give a sample for analysis. Dissolve the sample in a small amount of hexane, and subject the solution to gas chromatography under the conditions described below. Use commercially available cholesterol as the internal standard, and calculate the ratio of the weight to that of the starting oil based on the assumption that the ratio of FID detected area / detected weight is the same for all sterols. The calculated ratio is defined as the content of 24,25-methylenecholest-5-en-3  $\beta$  -ol.

[0045] Conditions of gas chromatography

Column: ULBON HR-1 (inner diameter 0.25 mm, length 25 m)

Column temperature: 280°C

Injection port and detector temperature: 300°C

Carrier gas and gauge pressure: helium 1.2 kg/cm<sup>2</sup>

Make-up gas and flow rate: nitrogen 70 ml/min.

Detector: FID

Split ratio: 20

#### Inventive Example 2

[0046] *Mortierella alpina* CBS527.72, *Mortierella alpina* ATCC42430, *Mortierella hygrophila* IFO5941, and *Mortierella elongata* IFO8570, as arachidonic acid-producing microorganisms, were cultivated separately. 600 Liter of a culture medium containing 4 % of glucose, 1 % of yeast extract, and 0.2 % soybean oil was placed in a 1000-1 tank, and culture with aeration and agitation was performed for 7 days at 28 °C with aeration at 1.0 vvm, agitation rate at 100 rpm, and the internal pressure of the tank of 0.5 kg/cm<sup>2</sup>G. Dried microbes were obtained after filtration and drying.

[0047] The dried microbes thus obtained were treated in the same manner as described in Inventive Example 1 and Comparative Example 1. The resultant refined oil preparations were analyzed for the content of unsaponifiable matters, the content of 24,25-methylenecholest-5-en-3  $\beta$  -ol, and the content of arachidonic acid.

[0048] The results are shown in Table 2.

[0049] It was found that treatment in a column can produce a refined oil preparation with a low content of 24,25-methylenecholest-5-en-3  $\beta$  -ol, while keeping the content of arachidonic acid unaffected.

Table 2

Strain		Unsaponifiable matters content (%)	24,25-methylenecholest-5-en-3 $\beta$ -ol content (%)	Arachidonic acid content (%)
M.alpina CBS527.72	Inventive Example	0.6	0.22	33
M.alpina CBS527.72	Comparative Example	1.6	0.62	33
M.alpina ATCC42430	Inventive Example	0.3	0.11	26
M.alpina ATCC42430	Comparative Example	0.9	0.33	27
M.hygrophila IFO5941	Inventive Example	0.5	0.15	23
M.hygrophila IFO5941	Comparative Example	1.6	0.52	22
M.elongata IFO8570	Inventive Example	0.4	0.23	21
M.elongata IFO8570	Comparative Example	1	0.58	21

#### Inventive Example 3

[0050] *Mortierella alpina* CBS754.68 as the arachidonic acid-producing microorganism was inoculated in a 2000-1 culture tank along with 1400 l of a culture medium containing 2 % of glucose, 1 % of yeast extract, and 0.1 % soybean oil, and culture with aeration and agitation was started at 24°C with aeration at 0.5 vvm, agitation rate at 100 rpm, and the internal pressure of the tank of 1.0 kg/cm<sup>2</sup>G. The concentration of glucose was maintained at 1.5% by fed-batch system, and the microbes were collected by filtration after 9-day cultivation, to give 20 kg of dried microbes. 15 Liter of hexane was added to 3 kg of the dried microbes thus obtained, and the mixture was gently stirred for 30 minutes. Then the filtrate obtained by suction filtration was subjected to evaporation in a rotary evaporator to remove the solvent, to give 1800 g of a crude oil extract.

[0051] 1000 Gram of the crude oil extract was treated in a column as described in Inventive Example 1, to give 900 g of a column-treated oil. 500 Gram of the column-treated oil and 800 g of the crude oil extract were subjected to distillation

for removal of unsaponifiable matters.

[0052] The column-treated oil, distillation-treated oil, and column-distillation-treated oil were separately deodorized by steam distillation, and 0.04% of tocopherol was added as an anti-oxidizing agent. The resultant refined oil preparations were analyzed for the content of unsaponifiable matters, the content of 24,25-methylenecholest-5-en-3  $\beta$  -ol, and the content of arachidonic acid.

[0053] The results are shown in Table 3.

[0054] It was proved that column-treatment and/or distillation can produce refined oil preparations with a low content of 24,25-methylenecholest-5-en-3  $\beta$  -ol, while keeping the content of arachidonic acid unaffected.

Table 3

Treatment	Unsaponifiable matters content (%)	24,25-methylenecholest-5-en-3 $\beta$ -ol content (%)	Arachidonic acid content (%)
Column treatment → deodorization	0.38	0.14	42
Distillation → deodorization	0.4	0.15	41
Column treatment → distillation → deodorization	0.36	0.13	43

#### Inventive Example 4

[0055] Cultivation was performed in the same manner as described in Inventive Example 1 and Comparative Example 1 except that 1 % of soybean protein (Trade Name: Esusan Meat, Ajinomoto Co., Inc.) was used in place of yeast extract. The oil preparations obtained were analyzed for the content of unsaponifiable matters, the content of 24,25-methylenecholest-5-en-3  $\beta$  -ol, and the content of arachidonic acid after the same treatment as described in Inventive Example 1 and Comparative Example 1. The results are shown in Table 4.

Table 4

	Unsaponifiable matters content	24,25-methylenecholest-5-en-3 $\beta$ -ol content	Arachidonic acid content
Inventive Example 4	0.5%	0.09%	37%
Comparative Example 4	1.1%	0.20%	37%

#### Inventive Example 5

[0056] *Mortierella alpina* ATCC 32221 as the arachidonic acid-producing microorganism was inoculated in a 50-l culture tank along with 25 l of a culture medium containing 4 % of glucose, 1.2 % of defatted soybean powder, 0.2 % potassium hydrogen phosphate, and 0.1% of soybean oil, and culture with aeration and agitation was performed for 5 days at 28°C with aeration at 1.0 vvm, agitation rate at 300 rpm, and the internal pressure of the tank of 1.0 kg/cm<sup>2</sup>G. Arachidonic acid-containing microbes were collected by filtration and drying. The microbes thus obtained were treated in the same manner as described in Inventive Example 1 and Comparative Example 1, and the resultant oil preparations were analyzed for the content of unsaponifiable matters, the content of 24,25-methylenecholest-5-en-3  $\beta$  -ol, and the content of arachidonic acid. The results are shown in Table 5.

Table 5

	Unsaponifiable matters content	24,25-methylenecholest-5-en-3 $\beta$ -ol content	Arachidonic acid content
Inventive Example 5	0.5%	0.02%	25%
Comparative Example 5	0.9%	0.05%	25%

Claims

1. Arachidonic acid-containing edible oil originating in microorganisms containing not more than 0.8 % by weight of unsaponifiable matters and 20 % by weight or more of arachidonic acid.
2. Arachidonic acid-containing edible oil originating in microorganisms as claimed in Claim 1, wherein the content of unsaponifiable matters is not more than 0.6 % by weight.
3. Arachidonic acid-containing edible oil originating in microorganisms as claimed in Claim 1 or Claim 2, wherein the content of 24,25-methylenecholest-5-en-3  $\beta$  -ol is not more than 0.3 % by weight.
4. Arachidonic acid-containing edible oil originating in microorganisms as claimed in Claim 3, wherein the content of 24,25-methylenecholest-5-en-3  $\beta$  -ol is not more than 0.15 % by weight.
5. Arachidonic acid-containing edible oil originating in microorganisms as claimed in any one of Claim 1 to Claim 4, wherein said microorganisms are microorganisms belonging to the subgenus *Mortierella* of the genus *Mortierella* and being capable of producing arachidonic acid.
6. Arachidonic acid-containing edible oil originating in microorganisms as claimed in Claim 5, wherein said microorganisms belonging to the subgenus *Mortierella* are those belonging to the species *alpina* of the subgenus *Mortierella*.
7. Foods including arachidonic acid-containing edible oil as claimed in any one of Claim 1 to Claim 6.
8. Formula for premature infants, infant formula, foods for infants, and foods for pregnant women and nursing mothers, including arachidonic acid-containing edible oil as claimed in any one of Claim 1 to Claim 6.



European Patent  
Office

**SUPPLEMENTARY  
EUROPEAN SEARCH REPORT**

Application Number  
EP 07 11 8999

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (IPC)
A	WO 94/28913 A (MARTEK BIOSCIENCES CORP [US]) 22 December 1994 (1994-12-22) * claims 30,42,4,45,52,53,55,59,60; examples 5,7 *	1-8	INV. A23D9/007
A	EP 0 726 321 A (OMEGATECH INC [US]) 14 August 1996 (1996-08-14) * page 6, lines 27-47; example 6 * * page 5, lines 1-24 * * page 12, lines 49-52 *	1-8	
A	EP 0 223 960 A (LION CORP [JP]) 3 June 1987 (1987-06-03) * page 4, lines 17-55; claims 1-20 *	1-8	
A	JP 63 116643 A (MARUTA KAZUMITSU) 20 May 1988 (1988-05-20) * abstract *	1-8	
A	JP 63 044891 A (SUNTORY LTD) 25 February 1988 (1988-02-25) * abstract *	1-8	
			TECHNICAL FIELDS SEARCHED (IPC)
			A23D A23L A23C
The supplementary search report has been based on the last set of claims valid and available at the start of the search.			
Place of search Munich		Date of completion of the search 16 January 2008	Examiner Adechy, Miriam
<p><b>CATEGORY OF CITED DOCUMENTS</b></p> <p>X: particularly relevant if taken alone Y: particularly relevant if combined with another document of the same category A: technological background O: non-written disclosure P: intermediate document</p> <p>T: theory or principle underlying the invention E: earlier patent document, but published on, or after the filing date D: document cited in the application L: document cited for other reasons</p> <p>&amp;: member of the same patent family, corresponding document</p>			

3  
EPO FORM 1503 (03.02.02) (P04004)



**ANNEX TO THE EUROPEAN SEARCH REPORT  
ON EUROPEAN PATENT APPLICATION NO.**

EP 07 11 8999

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned European search report.  
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on  
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

16-01-2008

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9428913	A	22-12-1994	AT 264099 T	15-04-2004
			AU 693450 B2	02-07-1998
			AU 6963594 A	03-01-1995
			CA 2164291 A1	22-12-1994
			DE 69433713 D1	19-05-2004
			DE 69433713 T2	07-04-2005
			DK 707487 T3	02-08-2004
			EP 0707487 A1	24-04-1996
			ES 2218525 T3	16-11-2004
			JP 8511533 T	03-12-1996
			PT 707487 T	31-08-2004
EP 0726321	A	14-08-1996	AT 219144 T	15-06-2002
			AU 711967 B2	28-10-1999
			AU 3799195 A	01-08-1996
			CA 2163278 A1	25-07-1996
			DE 69621663 D1	18-07-2002
			DE 69621663 T2	13-02-2003
			JP 8214893 A	27-08-1996
			JP 2006345866 A	28-12-2006
			US 5583019 A	10-12-1996
			US 5882703 A	16-03-1999
EP 0223960	A	03-06-1987	DE 3686026 D1	20-08-1992
			DE 3686026 T2	07-01-1993
			JP 7016424 B	01-03-1995
			JP 63012290 A	19-01-1988
JP 63116643	A	20-05-1988	JP 1861246 C	08-08-1994
			JP 5060331 B	02-09-1993
JP 63044891	A	25-02-1988	CA 1340433 C	16-03-1999
			JP 7034752 B	19-04-1995

REFERENCES CITED IN THE DESCRIPTION

*This list of references cited by the applicant is for the reader's convenience only. It does not form part of the European patent document. Even though great care has been taken in compiling the references, errors or omissions cannot be excluded and the EPO disclaims all liability in this regard.*

Patent documents cited in the description

- JP 63044891 A [0004]
- JP 63012290 A [0004]

Non-patent literature cited in the description

- LANCET, 1994, vol. 344, 1319-1322 [0003]
- LIPIDS, 1992, vol. 27 (6), 481-483 [0004]
- Standard Methods for the Analysis of Fats, Oils and Related Materials. Japan Oil Chemists' Society [0036]
- YUKAGAKU (Oil Chemistry. Journal of Japan Oil Chemists' Society, 1996, vol. 13, 489 [0037]